

## REMARKS

### **Rejections of Claims and Traversal Thereof**

In the March 3, 2005 Office Action,

claims 1-7 and 11-13 were rejected under 35 U.S.C. §112, second paragraph;

claim 8 was rejected under 35 U.S.C. §102(a) as being anticipated by Tewes et al. (WO99/09393);

claims 1-6 and 9-14 were rejected under 35 U.S.C. §103 as being unpatentable over Tewes et al. (WO99/09393) in view of Tolles (U.S. Patent No. 4,432,642); and

claim 7 was rejected under 35 U.S.C. §103 as being unpatentable over Tewes et al. (WO99/09393) in view of Salzman et al. (U.S. Patent No. 4,200,803).

These rejections are hereby traversed, and reconsideration of the patentability of amended claims herein is requested, in light of the ensuing remarks.

### **Rejection under 35 U.S.C. §112, second paragraph**

In the March 3, 2005 Office Action, claims 1-7 and 11-13 were rejected under 35 U.S.C. §112, second paragraph, as being indefinite for failing to particularly point out and distinctly claim the subject matter which applicant regards as the invention. Applicant has amended the claims according to the suggestion of Examiner Wallenhorst, thereby obviating this rejection. Applicant respectfully requests the withdrawal of this rejection under 35 U.S.C. §112, second paragraph.

### **Rejection under 35 U.S.C. §102(a)**

Claim 8 was rejected under 35 U.S.C. §102(a) as being anticipated by Tewes et al. (WO99/09393). Applicant submits that the cited reference does not defeat the patentability of the presently claimed

invention because it cannot be considered as competent prior art. The publication date of Tewes et al. (WO99/09393) is February 25, 1999, and applicant filed his priority document on February 18, 1999 in the German Patent Office. An English translation of DE 199 07 011.3 is enclosed herewith (Appendix A) thereby providing proof that applicant may rely on the filing date of the foreign priority application. Notably, the priority document for the corresponding PCT Application PCT/DE00/00438 was submitted to the United States Receiving Branch.

Applicant requests that this rejection under 35 U.S.C. §102(a) be withdrawn.

**Rejection under 35 U.S.C. §103(a)**

Claims 1-6 and 9-14 were rejected under 35 U.S.C. §103 as being unpatentable over Tewes et al. (WO99/09393) (primary reference) in view of Tolles (U.S. Patent No. 4,432,642); and claim 9 over Tewes et al. (WO99/09393) in view of Salzman et al. (U.S. Patent No. 4,200,803). Applicant submits that the proposed combinations do not render the presently claimed invention as obvious.

As discussed above, the Tewes et al. reference is not competent prior art, and thus, cannot be included in the proposed combinations to establish a *prima facie* case of obviousness. Further, the Tolles et al. reference discloses only sample vessels with flat bottoms (see Tolles, Figures 3, 5, and 6), which do not in any manner focus light, much less focus light to a focal point within the sample vessel, as expressly required by claims 1-6 and 9-14 of the present application. Thus, this secondary reference does not teach or suggest all of the elements of the presently claimed invention.

Likewise, the Salzman et al. reference, without the primary reference, does not meet the requirements for establishing a *prima facie* case of obviousness. Salzman discloses a cell analysis apparatus with a paraboloidal cavity having a focus and light reflecting walls (see Salzman, Figure 1, and column 1, lines 37-40), so that a laser beam 25 can be directed through the focus 20 of such paraboloidal cavity to meet cells at a perpendicular angle (see Salzman, Figure 3, and column 1, lines 40-42, and column 2, lines 32-34), scattered or fluoresced by the cells at such focus 20, and then reflected by the reflective walls of the paraboloidal cavity to form a parallel light beam, which can be collected for analysis (see Salzman, Figures 1 and 2, and column 1, lines 42-44 and column 2, lines 46-52). It is clear that such impinging laser beam 25 is NOT reflected and focused by the paraboloidal cavity disclosed by Salzman. Instead,

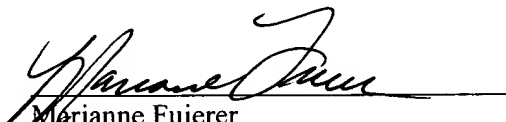
the impinging laser beam 25 is reflected and parallelized by the paraboloidal cavity of Salzman. Thus, this reference does not teach or suggest all of the elements of applicant's claimed invention.

In light of the above discussion and the fact that the proposed combinations do not teach or suggest each and every recited element of applicant's claimed invention, applicant submits that the Office has established a *prima facie* case of obviousness. Accordingly, applicant respectfully requests that the rejection of the pending claims, on the basis of obviousness, be withdrawn.

### **Conclusion**

Applicant has satisfied the requirements for patentability. All pending claims are free of the art and fully comply with the requirements of 35 U.S.C. §112. It therefore is requested that Examiner Wallenhorst reconsider the patentability of all pending claims, in light of the distinguishing remarks herein and withdraw all rejections, thereby placing the application in condition for allowance. Notice of the same is earnestly solicited. In the event that any issues remain, Examiner Wallenhorst is requested to contact the undersigned attorney at (919) 419-9350 to resolve same.

Respectfully submitted,

  
Marianne Fuierer  
Reg. No. 39983  
Attorney for Applicant

INTELLECTUAL PROPERTY/  
TECHNOLOGY LAW  
P.O. Box 14329  
Research Triangle Park, NC 27709  
Phone: (919) 419-9350  
Fax: (919) 419-9354  
Attorney File No.: 4139-122

# Appendix A

## CERTIFICATION OF TRANSLATION

of  
" US 09/913,575 (USA) "

I, Peggy Fallin Wright, c/o Technisches Fachübersetzungsbüro,  
Försterweg 33, A-2136 Laa/Thaya, Austria,  
am the translator of the documents attached and certify that  
the following is a true translation to the best of my knowledge  
and belief.

*Peggy Fallin Wright*  
Signature of translator

dated this 10<sup>th</sup> day of April, 2005



⑩ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 199 07 011 A 1**

⑥ Int. Cl. 7:  
**G 01 J 3/443**  
G 01 N 21/64

⑳ Aktenzeichen: 199 07 011.3  
㉑ Anmeldetag: 18. 2. 1999  
㉒ Offenlegungstag: 31. 8. 2000

DE 199 07 011 A 1

⑦① Anmelder:  
Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des  
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE

⑦④ Vertreter:  
Castell, K., Dipl.-Ing. Univ. Dr.-Ing.; Reuther, M.,  
Dipl.-Phys., Pat.-Anw., 52349 Düren

⑦② Erfinder:  
Langowski, Jörg, Prof. Dr., 69120 Heidelberg, DE

⑥⑥ Entgegenhaltungen:  
DE 44 05 375 C2  
DE 24 61 769 C2  
DE 197 35 119 A1  
DE 40 16 617 A1  
DE 36 19 107 A1  
DD 2 44 203 A1  
GB 20 44 951 A  
US 44 32 642  
EP 03 47 579 A2  
EP 01 06 662 A2  
WO 97 19 339 A1  
JP 61-2 15 947 A

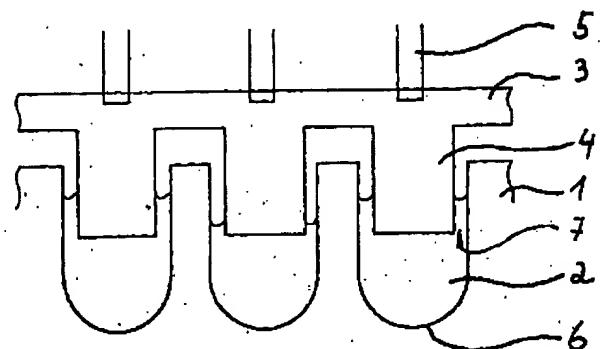
Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑥④ Fluoreszenzkorrelationsspektroskopievorrichtung und -verfahren, insbesondere zur  
Mehrfarbenfluoreszenzkorrelationsspektroskopie

⑥⑦ Eine Vorrichtung zur Fluoreszenzkorrelationsspektro-  
skopie, insbesondere zur Mehrfarbenfluoreszenzkorrelati-  
onsspektroskopie, bei der Lichtstrahlen in einem transpa-  
renten Medium fokussiert werden, welches sich in einem  
Probengefäß (2) befindet, umfaßt einen Gefäßhalter (1),  
in welchem zumindest zwei Probengefäße (2) mit einem  
fokussierenden, verspiegelten Boden (6) angeordnet  
sind, und eine gemeinsame Abdeckung (3) für beide Pro-  
bengefäße (2), die zumindest teilweise lichtdurchlässig  
ist.

Bei einem entsprechenden Verfahren wird in das Proben-  
gefäß (2) ein Stempel (4) mit einem dem Boden (6) zuge-  
wandten Lichtfenster eingeführt und die Menge des  
transparenten Mediums derart gewählt, daß das Lichtfen-  
ster des Stempels (4) von dem Medium benetzt wird.



DE 199 07 011 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, insbesondere zur Mehrfarbenfluoreszenzkorrelationsspektroskopie. Hierbei werden Reaktionspartner mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und in einem flüssigen, transparenten Medium frei diffundieren gelassen. Auftretende Fluktuationen der Fluoreszenzintensität können mit optischen Verfahren detektiert werden. Insbesondere bei der Mehrfarbenfluoreszenzkorrelationsspektroskopie werden molekulare Wechselwirkungen untersucht, indem zwei Reaktionspartner mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Die Reaktionspartner erzeugen bei ihrer Diffusion durch das transparente Medium Fluktuationen der Fluoreszenzintensität. Werden überwiegend korrelierte Intensitätsfluktuationen zwischen den Emissionswellenlängen der beiden Fluorophore detektiert, so deutet dieses auf eine Komplexbildung zwischen den beiden Partnern hin.

Für derartige Untersuchungen werden typischerweise kleinste Probenmengen verwendet, da sich das untersuchbare Raumvolumen auf einen Raumbereich in unmittelbarer Umgebung eines Fokusses, auf welchen Lichtstrahlen in dem transparenten Medium fokussiert werden, beschränkt.

Andererseits ist es notwendig, damit die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie mit allen ihren Vorteilen einer möglichst breiten Anwendung zugeführt werden kann, eine möglichst unkomplizierte und routinemäßige Durchführung dieses Meßverfahrens zu ermöglichen.

Es ist somit Aufgabe vorliegender Erfindung, eine gattungsgemäße Vorrichtung sowie ein gattungsgemäßes Verfahren zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, insbesondere zur Mehrfarbenfluoreszenzkorrelationsspektroskopie, bereit zu stellen, welche einerseits eine routinemäßige Durchführung von Messungen und andererseits gleichwohl ein Beherrschen kleinster Probenmengen ermöglichen.

Als Lösung schlägt die Erfindung einerseits eine gattungsgemäße Vorrichtung vor, die einen Gefäßhalter, in welchem zumindest zwei Probengefäße mit einem fokussierenden, verspiegelten Boden angeordnet sind, und eine gemeinsame Abdeckung für beide Probengefäße umfaßt, die zumindest teilweise lichtdurchlässig ist.

Eine derartige Vorrichtung läßt sich auch in kleinsten Abmessungen mit ausreichender Genauigkeit fertigen, so daß kleinste Probenvolumina innerhalb derartiger, kleiner Probengefäße für eine Messung zur Verfügung stehen. Darüber hinaus ermöglicht die Anordnung mehrerer Probengefäße in einem Gefäßhalter, daß diese ohne Weiteres gleichzeitig bzw. kurz hintereinander für eine Messung vorbereitet werden können. Auch ist es möglich, die entsprechende Meßapparatur mit einer Haltevorrichtung bzw. Transportvorrichtung für den Gefäßhalter zu versehen, so daß der Inhalt der jeweiligen Probengefäße ohne weiteren Aufwand hintereinander oder sogar gleichzeitig einer Messung zugeführt werden kann. Die auf diese Weise beschriebene, erfindungsgemäße Anordnung ermöglicht somit aufgabengemäß einerseits die Verwendung kleinster Probenmengen und ermöglicht andererseits eine nahezu fließbandartige Probenpräparation bzw. Durchführung der Messung.

Durch den fokussierenden, verspiegelten Boden ist es darüber hinaus möglich, die anregenden Lichtstrahlen senkrecht in das transparente Medium einfallen zu lassen und sie erst innerhalb des Mediums zum Fokus hin abzulenken. Hierdurch können Meßfehler, die durch unterschiedliche Brechungsindizes und verschiedene Frequenzen des einfallenden Lichtes bedingt sind, vermieden bzw. auf ein Minimum reduziert werden.

Vorteilhafterweise wird das Probengefäß soweit gefüllt,

daß es die Abdeckung erreicht. Auf diese Weise ist gewährleistet, daß ein Lichteinfall in das Probengefäß lediglich von der Abdeckungsgeometrie und nicht von irgendwelchen Oberflächenspannungen des transparenten Mediums oder ähnlichem abhängt.

Ein konstruktiv verhältnismäßig einfacher Aufbau der Gesamtanordnung folgt, wenn die Probengefäße durch Ausformungen in dem Gefäßhalter gebildet werden. Bei einer derartigen Anordnung ist es möglich, den Gefäßhalter einstückig auszubilden und mit jedem geeigneten Verfahren Vertiefungen in denselben einzubringen, die als Probengefäße dienen.

Hierbei ist lediglich der Boden dieser Ausformungen in erfindungsgemäßer Weise fokussierend auszubilden.

Der Boden kann hierbei parabolisch oder auch elliptisch geformt sein. Ebenso ist in bestimmten Grenzen ein halbkugelschalenförmiger Boden denkbar.

Um eine langfristige Haltbarkeit der Verspiegelung zu gewährleisten, kann der Boden mit einer gegenüber üblichen Pufferlösungen resistenten Schicht verspiegelt werden.

Hierbei sollte der Fokus des Probengefäßes derart gewählt sein, daß er innerhalb des Probengefäßes liegt. Bei einer derartigen Anordnung kann auf komplexe Optiken, die das einfallende Licht vorab in geeigneter Weise ablenken, verzichtet werden, wodurch insbesondere auch die Gefahr von Meßfehlern durch unterschiedliche Brechungswinkel reduziert wird.

An jedem Probengefäß kann ein Druckausgleich vorgesehen sein. Ein derartiger Druckausgleich ermöglicht es, einerseits jedes Probengefäß in beliebiger Weise zu füllen oder zu entleeren und/oder andererseits zu gewährleisten, daß Baugruppen, wie eine Abdeckung bzw. ein in der Abdeckung vorgesehenes Lichtfenster in die in dem Probengefäß erhaltene Flüssigkeit eintauchen bzw. vollständig von dieser benetzt werden können. Wie bereits vorstehend erläutert, ermöglicht diese Benetzung bzw. dieses Eintauchen, daß die Oberflächenrichtung der Flüssigkeit nicht zufällig sondern durch die Oberfläche der Abdeckung bzw. die Oberfläche eines Lichtfensters bestimmt wird. Es versteht sich, daß ein derartiger Druckausgleich auch unabhängig von den übrigen Merkmalen der erfindungsgemäßen Vorrichtung vorteilhaft für eine Vorrichtung zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie Anwendung finden kann.

In vorliegendem Zusammenhang wird unter dem Begriff "Lichtfenster" eine Baugruppe bzw. ein Bereich der Abdeckung verstanden, durch welchen Licht zur Fluoreszenzanregung durch die Abdeckung hindurch in ein jeweiliges Probengefäß gestrahlt wird.

Beispielsweise kann die Abdeckung als planparallele Platte ausgebildet sein, die auf dem Gefäßhalter plan aufliegt und die Probengefäße abdeckt. Hierbei besteht jedoch in der Regel die Schwierigkeit, die darunterliegenden Gefäße zumindest derart vollständig mit dem flüssigen Medium zu füllen, daß wenigstens die jeweiligen Lichtfenster benetzt sind. Durch geeignete Maßnahmen, wie Abdichtungen, genaue Dosierungen und Beherrschung der Adhäsions- und Kohäsionskräfte lassen sich diesbezüglich Wege finden.

Diese Probleme lassen sich vermeiden, wenn an der Abdeckung ein Stempel vorgesehen ist, der jeweils in ein Probengefäß hineinragt. Durch den Spalt zwischen Stempel und Probengefäßwand kann nunmehr ein Druckausgleich stattfinden, so daß das Probengefäß nicht mehr mit allerhöchster Genauigkeit befüllt werden muß. Etwaige Luft bzw. zuviel vorhandenes transparentes Medium können an den Seiten abgeführt werden. Insbesondere kann durch einfache Maßnahmen, wie beispielsweise kleine Kanäle oder Ablauflöcher, vermieden werden, daß transparentes Medium in benachbarte Probengefäße gelangt.

Vorteilhafterweise sind die Lichtfenster der Abdeckung jeweils in den Stempeln vorgesehen.

Die Stempel können einerseits einstückig mit der Abdeckung ausgestaltet sein. Andererseits ist es möglich, daß die Stempel durch Enden von Lichtleitfasern gebildet werden, die mit der Abdeckung verbunden sind und durch diese hindurch in die Probengefäße hineinragen.

Vorteilhafterweise ist der Stempel derart dimensioniert, daß zwischen ihm und dem Probengefäß ein um den Stempel umlaufender Spalt verbleibt. Dieser Spalt wird ausreichend groß gewählt, so daß kein transparentes Medium aus dem Probengefäß herausströmt, wenn der Stempel in das Probengefäß eintaucht und seine Meßposition erreicht. Der durch diesen Spalt gebildete Raum dient somit als Puffer, der verschiedene Füllmengen, insbesondere im Rahmen einer Meßgenauigkeit, ausgleichen kann.

Es versteht sich, daß ein derartiger, in ein Probengefäß eintauchender Stempel auch unabhängig von den übrigen Merkmalen bei einem einzelnen Probengefäß für eine Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie vorteilhaft Verwendung finden kann. Insbesondere braucht dann das Probengefäß nicht mit einem genau bemessenem Füllvolumen befüllt zu werden. Dieses ist insbesondere bei kleinen Probenmengen von großem Vorteil, da bei diesen um so schwerer genaue Volumina abgemessen werden können. Insofern ermöglicht ein derartiger Stempel auch unabhängig von den übrigen Merkmalen, daß bei kleinsten Probenmengen mit verhältnismäßig großen Toleranzen und somit unter verhältnismäßig unkomplizierten und schnell ausführbaren Bedingungen Messungen durchgeführt werden können.

Auch schlägt die Erfindung ein Verfahren zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, insbesondere zur Mehrfarbenfluoreszenzkorrelationsspektroskopie, vor, bei dem Lichtstrahlen in einem transparenten Medium fokussiert werden, welches sich in einem Probengefäß befindet. Hierbei wird in das Probengefäß, welches einen fokussierenden Boden aufweist, ein Stempel mit einem dem Boden zugewandten Lichtfenster eingeführt und die Menge des transparenten Mediums derart gewählt, daß das Lichtfenster des Stempels von dem Medium benetzt wird.

Vorteilhafterweise wird der Stempel lediglich bis oberhalb des Fokusses in das Probengefäß eingeführt, so daß durch das Lichtfenster einfallendes Licht durch den Boden in den Fokus fokussiert werden kann und dort, in dem transparenten Medium, eine gewünschte Messung initiiert.

Das Verfahren gestaltet sich besonders einfach, wenn der Stempel in das transparente Medium eintaucht. Auf diese Weise ist in jedem Falle eine ausreichende Benetzung gewährleistet.

Weist der Stempel einen zur optischen Achse des fokussierenden Probengefäßbodens senkrechten Oberflächenbereich auf, so wird auf einfache, konstruktive Weise gewährleistet, daß durch den Stempel einfallendes Licht nicht unnötigerweise gebrochen wird. Hierdurch lassen sich Fehler, die durch Licht verschiedener Frequenzen bedingt sind, vermeiden.

Es versteht sich, daß die im vorliegenden Zusammenhang angesprochenen geometrischen Verhältnisse, wie "senkrecht", "elliptisch" bzw. "parabolisch" und ähnliches, lediglich im Rahmen der für die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie gewünschten Meßgenauigkeiten exakt gewählt werden brauchen. Insbesondere der Boden sollte auf einen Bruchteil der verwendeten Wellenlängen genau gefertigt sein. Auch die Abweichungen der Abdeckung, des Stempels bzw. der geometrischen Lage des Lichtfensters sind entsprechend der verwendeten Wellenlängen größer oder kleiner zu wählen.

Es ist darüber hinaus möglich, in der Wandung des Pro-

bengefäßes eine Öffnung vorzusehen, die in eine Zuführleitung und/oder eine Abführleitung für das transparente Medium mündet. Derartige Leitungen können beispielsweise durch einfache Bohrungen in dem Gefäßhalter gewährleistet sein. Ebenso könnten an der Gefäßhalteroberfläche unmittelbar unter der Abdeckung Nuten vorgesehen werden, die, wenn durch die Abdeckung abgedeckt, derartige Kanäle bilden. Derartige schlichte Öffnungen bzw. derartige Kanäle können auch in kleinsten Geometrien ohne Weiteres mit bereits bekannten technischen Verfahren in einem Gefäßhalter bereitgestellt werden. Derartige Leitungen können einerseits einem Druckausgleich und andererseits einer Zufuhr bzw. Abfuhr des transparenten Mediums oder aber auch anderer Substanzen, wie Meßsubstanzen oder Reinigungssubstanzen, dienen.

Da bei derartigen, schlichten Öffnungen auf jegliche konstruktive Feinheiten, wie kapillarartigen Zuführungen bis in den Fokus hinein und ähnliches, verzichtet wird, sind derartige Anordnungen auch bei kleinsten Probengefäßgrößen realisierbar. Auch diese fördern eine schnelle und serielle Durchführung der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, wobei es sich versteht, daß derartige Öffnungen auch unabhängig von der Zahl der verwendeten Probengefäße und dem Vorhandensein einer Abdeckung vorteilhaft Verwendung finden können.

Weitere Vorteile, Ziele und Eigenschaften vorliegender Erfindung werden anhand der Beschreibung anliegender Zeichnung erläutert, in welcher beispielhaft zwei erfindungsgemäße Vorrichtungen zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie dargestellt sind. In der Zeichnung zeigen:

Fig. 1 einen schematischen Schnitt durch eine erste erfindungsgemäße Vorrichtung und

Fig. 2 einen schematischen Schnitt durch eine zweite erfindungsgemäße Vorrichtung.

Die in Fig. 1 dargestellte erste Ausführungsform der Erfindung weist einen Gefäßhalter 1 auf, in welchen Ausformungen als Probengefäße 2 (exemplarisch beziffert) eingebracht sind. Darüber hinaus umfaßt diese Ausführungsform eine Abdeckung 3 mit durchsichtigen Stempeln 4 (exemplarisch beziffert), die in abgedecktem Zustand in die Probengefäße 2 hineinragen.

Auf der gegenüberliegenden Seite der Abdeckung 3 sind Lichtleiter 5 (exemplarisch beziffert) vorgesehen, durch welche Licht durch die Stempel 4 hindurch in die Probengefäße 2 und aus diesen herausgeleitet werden kann. Es versteht sich, daß die Lichtleiter 5 auch statt der Stempel 4 vorgesehen sein können und durch die Abdeckung 3 hindurch in die Probengefäße 2 hineinragen können.

Der Boden 6 (exemplarisch beziffert) eines jeden Probengefäßes ist fokussierend ausgeformt und an seiner Innenseite mit einer gegenüber üblichen Pufferlösungen resistenten Schicht verspiegelt.

Zum Betrieb dieser Vorrichtung werden die Probengefäße 2 nach Bedarf mit einem transparenten Medium befüllt. Dieses geschieht soweit, daß nach Aufsetzen der Abdeckung 3 die Stempel 4 jeweils in das transparente Medium eintauchen. Insofern dient der zwischen Probengefäß 2 und Stempel 4 vorhandene Spalt 7 (exemplarisch beziffert) als Druckausgleich und als Zwischenspeicher für zuviel eingefülltes transparentes Medium.

Dadurch daß die Unterseite der Stempel 7 einen zur optischen Achse des fokussierenden Probengefäßbodens 6 senkrechten Oberflächenbereich aufweist und daß Licht aus dem Lichtleiter 5 annähernd senkrecht durch ein in diesem Oberflächenbereich befindliches Lichtfenster in das Probengefäß 2 gelangt, braucht die Abdeckung 3 nicht sehr genau bezüglich der Probengefäße 2 positioniert werden. Leichte seitliche Abweichungen spielen wegen des parallelen Lichtein-



falls und des entsprechend fokussierend gewählten Bodens 6 keine Rolle.

Bei der in Fig. 2 dargestellten Ausführungsform sind in einem Gefäßhalter 1 Probengefäße 2 (exemplarisch beziffert) mit fokussierenden, verspiegelten Böden 6 (exemplarisch beziffert) vorgesehen. Auf dem Gefäßhalter 1 liegt eine Abdeckung 3 mit einer planen Unterseite auf, in welche den Probengefäßen 2 entsprechend Lichtleiter 5 (exemplarisch beziffert) eingebracht sind. Darüber hinaus sind in jeder Probengefäßwand Öffnungen 8 (exemplarisch beziffert) vorgesehen, die in Zufuhr- bzw. Abfuhrleitungen 9 (exemplarisch beziffert) münden. Diese dienen einerseits als Druckausgleich bzw. Überlauf und verhindern auf diese Weise, daß bei Auflegen der Abdeckung 3 transparentes Medium über die Probengefäßwandung hinaus in andere Probengefäße 2 gelangt. Bei aufgelegter Abdeckung 3 können diese Leitungen 9 darüber hinaus dafür genutzt werden, Probenflüssigkeit auszutauschen bzw. die Probengefäße 2 zu spülen.

Die Leitungen 9 können einerseits durch Bohrungen (wie dargestellt) bereitgestellt werden. Andererseits können in der Oberseite des Gefäßhalters 1 Nuten oder andere Ausnehmungen vorgesehen sein, die gemeinsam mit der Abdeckung 3 die Leitungen 9 bilden. Es ist denkbar, eine der Öffnungen 8 im Bodenbereich des Probengefäßes 2 vorzusehen.

Die Durchmesser der Öffnungen 8 und der Leitungen 9 sowie deren Lage sind derart gewählt, daß ein vollständiges Befüllen der Probengefäße möglich ist. Wie aus Fig. 2 unmittelbar ersichtlich, ist es auch möglich, die Lichtleiter 5 durch die Abdeckung 3 bis in die Probengefäße 2 hindurchzuführen. Dann ist ein vollständiges Befüllen der Probengefäße 2 nicht mehr notwendig.

#### Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, insbesondere zur Mehrfarbenfluoreszenzkorrelationsspektroskopie, bei der Lichtstrahlen in einem transparenten Medium fokussiert werden, welches sich in einem Probengefäß (2) befindet, **gekennzeichnet durch** einen Gefäßhalter (1), in welchem zumindest zwei Probengefäße (2) mit einem fokussierenden, verspiegelten Boden (6) angeordnet sind, und eine gemeinsame Abdeckung (3) für beide Probengefäße (2), die zumindest teilweise lichtdurchlässig ist.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Probengefäße (2) durch Ausformungen in dem Gefäßhalter (1) gebildet sind.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Fokus innerhalb der Probengefäße (2) liegt.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß jedes Probengefäß (2) eine Druckausgleich aufweist.
5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Abdeckung (3) zumindest zwei Stempel (4) aufweist, die jeweils in ein Probengefäß (2) hineinragen.
6. Vorrichtung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß zumindestens ein Stempel (4) derart dimensioniert ist, daß zwischen dem Stempel (4) und dem Probengefäß (2) ein um den Stempel (4) umlaufender Spalt (7) verbleibt.
7. Vorrichtung nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest ein Stempel (4) einen zur optischen Achse des fokussierenden Probengefäßbodens (6) senkrechten Oberflächenbereich aufweist.

8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß in der Wandung des Probengefäßes (2) eine Öffnung (8) vorgesehen ist, die in eine Zufuhr- und/oder Abfuhrleitung für das transparente Medium mündet.

9. Verfahren zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, insbesondere zur Mehrfarbenfluoreszenzkorrelationsspektroskopie; bei dem Lichtstrahlen in einem transparenten Medium fokussiert werden, welches sich in einem Probengefäß (2) befindet, dadurch gekennzeichnet, daß in das Probengefäß (2), welches einen fokussierenden Boden (6) aufweist, ein Stempel (4) mit einem dem Boden (6) zugewandten Lichtfenster eingeführt und die Menge des transparenten Mediums derart gewählt wird, daß das Lichtfenster des Stempels (4) von dem Medium benetzt wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Stempel (4) bis oberhalb des Fokusses des Bodens (6) eingeführt wird.

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Stempel (4) in das transparente Medium eintaucht.

---

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

---

- Leerseite -

Fig. 1

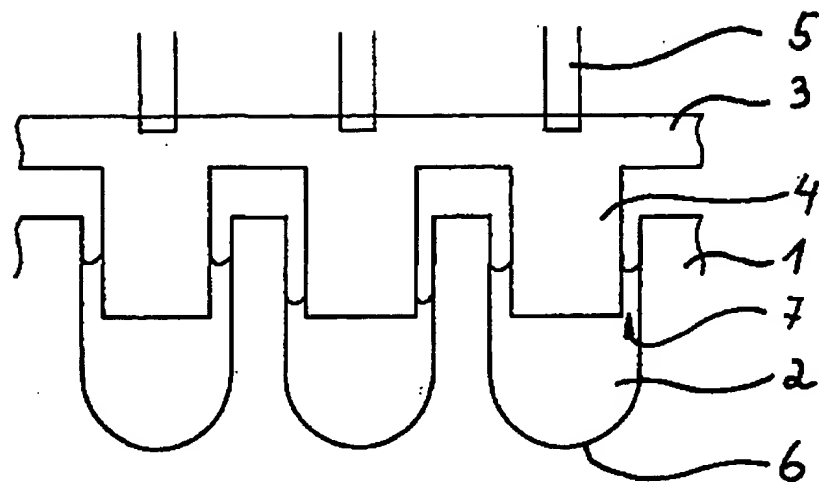
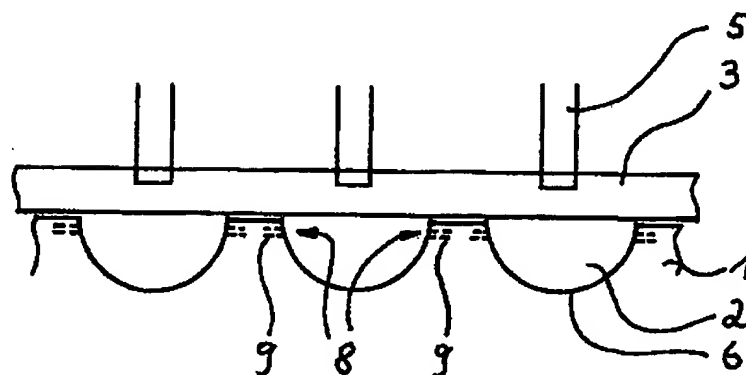


Fig. 2



DEVICE AND METHOD FOR FLUORESCENCE CORRELATION  
SPECTROSCOPY, ESPECIALLY FOR MULTICOLOR FLUORESCENCE  
CORRELATION SPECTROSCOPY

5 The invention relates to a device and a method for  
fluorescence correlation spectroscopy, especially for  
multicolor fluorescence correlation spectroscopy. In this  
method, reactants are marked with fluorescent dyes and  
allowed to diffuse freely in a transparent liquid medium.  
10 Any fluctuations in the fluorescence intensity can be  
detected by optical methods. In multicolor fluorescence  
correlation spectroscopy in particular, molecular  
interactions are investigated by labelling two reactants  
with different fluorescent dyes. The reactants produce  
15 fluctuations of the fluorescence intensity as they diffuse  
through the transparent medium. If predominantly correlated  
intensity fluctuations between the emission wavelengths of  
the two fluorophors are detected, this indicates that a  
complex is formed involving the two reactants.

20 Typically extremely small sample quantities are used for  
such investigations since the spatial volumes to be  
investigated are confined to a region of space in the  
immediate vicinity of a focus to which light rays are  
25 focussed in the transparent medium.

On the other hand, in order for fluorescence correlation  
spectroscopy with all its advantages to have the widest  
possible application, it is essential for the  
30 implementation of the measurement method to be as  
uncomplicated and routine as possible.

The problem for the present invention is thus to make  
available a generic device and a generic method for  
35 fluorescence correlation spectroscopy, especially for  
multicolor fluorescence correlation spectroscopy, which on  
the one hand can be used for routine implementation of

measurements and on the other hand can also cope with very small sample quantities.

5 As a solution the invention proposes on the one hand a generic device which comprises a vessel holder in which at least two sample vessels with a focussing, reflective bottom are provided, and a common cover for both sample vessels which is at least partly transparent to light.

10 Such a device can also be fabricated in extremely small dimensions with sufficient precision so that very small sample volumes are available for a measurement inside such small sample vessels. In addition, the arrangement of several sample vessels in one vessel holder means that  
15 these can easily be prepared for a measurement at the same time or shortly after one another. It is also possible to provide the corresponding measurement apparatus with a holding device or transporting device for the vessel holder so that the contents of each sample vessel can be supplied  
20 for a measurement one after the other or even simultaneously without any further effort. The arrangement according to the invention described in this manner thus, on the one hand, makes it possible to use extremely small sample volumes according to the statement of problem and,  
25 on the other hand, allows almost continuous sample preparation or measurements.

By means of the focussing, reflecting bottom, it is also possible for the exciting light rays to be incident  
30 perpendicularly in the transparent medium and merely deflected to the focus inside the medium. By this means measurement errors caused by the different refractive indices and different frequencies of the incident light can be avoided or minimized.

35 Preferably the sample vessel is filled so far that it reaches the cover. This ensures that any light incident in

the sample vessel merely depends on the sample geometry and not on any surface tension of the transparent medium or the like.

5 The complete arrangement has a relatively simple design if the sample vessels are formed by recesses in the vessel holder. With such an arrangement it is possible to construct the vessel holder in one piece and by any suitable method to introduce recesses which serve as sample  
10 vessels. In this case, only the bottom of these recesses should be constructed as focussing in a fashion according to the invention.

The bottom may have a parabolic or elliptical shape. A  
15 hemispherical bottom is also feasible within certain limits.

In order to ensure that the reflection coating has long-term durability, the bottom may be mirrorized with a layer  
20 resistant to conventional buffer solutions.

In this case the focus of the sample vessel should be selected so that it is inside the sample vessel. With such an arrangement, there is no need for complex optics which  
25 preliminarily deflect the incident light in a suitable fashion, so that the risk of measurement errors caused by different angles of refraction is reduced in particular.

Pressure equalization may be provided at each sample  
30 vessel. Such pressure equalization on the one hand allows each sample vessel to be filled or emptied in an arbitrary fashion and/or on the other hand ensures that modules such as a cover or a light window provided in the cover can be immersed in the liquid contained in the sample vessel or  
35 completely wetted by said liquid. As already explained at the beginning, this wetting or immersion ensures that the surface direction of the liquid is not random but is

determined by the surface of the cover or the surface of a light window. It is understood that such pressure equalization can also be used independently of the other features of the device according to the invention  
5 advantageously for fluorescence correlation spectroscopy.

In the present context the term "light window" is understood to be a module or an area of the cover through which light for fluorescence excitation is directed into an  
10 appropriate sample vessel.

For example, the cover may be designed as a plane-parallel plate lying horizontally on the vessel holder and covering the sample vessels. In this case, however, there is usually  
15 the difficulty of completely filling the lower vessels with liquid medium such that at least the appropriate light windows are wetted. Relevant methods can be found by suitable methods such as seals, accurate dosing and overcoming the adhesive and cohesive forces.

20 These problems can be avoided if a plunger protruding into each sample vessel is provided on the cover. Pressure equalization can also be achieved by means of the gap between the plunger and the walls of the sample vessel, so  
25 that the sample vessel need no longer be filled with the highest possible precision. Any air or too much transparent medium can be removed at the sides. In particular, by means of simple measures, e.g., small channels or drain holes, transparent medium can be prevented from reaching  
30 neighboring sample vessels.

The light windows of the cover are advantageously provided in each plungers.

35 On the one hand, the plunger may be shaped in one piece with the cover. On the other hand, it is possible for the plunger to be formed by the ends of optical fibers which

are connected to the cover and protrude through this into the sample vessels.

5 The plunger is advantageously dimensioned so that between it and the sample vessel there is a gap around the plunger. This gap is selected to be large enough so that no transparent medium flows out from the sample vessel if the plunger is immersed in the sample vessel and reaches its measuring position. The space formed by this gap thus  
10 serves as a buffer which can equalize different filling quantities, especially within the limits of measurement accuracy.

It is understood that such a plunger immersing in the  
15 sample vessel can also be used advantageously with an individual sample vessel for fluorescence correlation spectroscopy regardless of the other features. Especially the sample vessel then does not need to be filled with an exactly measured filling volume. This is of great advantage  
20 especially with small sample quantities since it is all the more difficult to measure precise volumes with these. In this respect, regardless of the other features, such a plunger also makes it possible to make measurements using extremely small sample quantities with relatively large  
25 tolerances and thus under relatively complicated and rapidly executable conditions.

The invention also proposes a method for fluorescence correlation spectroscopy, especially for multicolor  
30 fluorescence correlation spectroscopy, whereby light rays are focussed in a transparent medium which is located in a sample vessel. In this case, in the sample vessel which has a focussing bottom there is inserted a plunger having a light window facing the bottom and the quantity of  
35 transparent medium is selected so that the light window of the plunger is wetted by the medium.



Advantageously the plunger is only inserted to a position above the focus in the sample vessel so that the light incident through the light window can be focussed through the bottom into the focus and there initiates a desired measurement, in the transparent medium.

The method turns out to be particularly simple if the plunger is immersed in the transparent medium. In this way sufficient wetting is ensured in any case.

10

If the plunger has a surface area perpendicular to the optical axis of the focussing sample vessel bottom, this ensures in a simple design fashion that light incident through the plunger is not refracted unnecessarily. By this means errors caused by light of different frequencies are avoided.

It is understood that the geometric relationships discussed in the present context such as "perpendicular", "elliptical" and "parabolic" and similar need only be selected exactly within the limits of the desired measurement accuracies for the fluorescence correlation spectroscopy. In particular, the bottom should be fabricated exactly to a fraction of the wavelengths used. Also the deviations of the cover, the plunger or the geometric position of the light window are to be selected larger or smaller according to the wavelengths used.

It is also possible to provide an opening in the wall of the sample vessel which opens into a supply line and/or a drain line for the transparent medium. These lines can be provided for example by simple holes in the vessel holder. Likewise on the surface of the vessel holder directly below the cover there can be provided grooves which, when covered by the cover, form such channels. These simple openings or channels in a vessel holder can easily be prepared even in the smallest geometries using already known technical

methods. These lines can be used on the one hand for pressure equalization and on the other hand for supply or removal of the transparent medium or other substances such as measuring substance or cleaning substances.

5

Since any design refinements such as capillary-like feeds to the focus and similar are omitted with these simple openings, these configurations can be implemented even with the smallest sample vessel sizes. These are also conducive to fast and serial implementation of fluorescence correlation spectroscopy, whereby it is understood that these openings can also be used advantageously independently of the number of sample vessels used and the presence of a cover.

15

Other advantages, aims and properties of the present invention are explained using the description of the appended drawings which show, for example, two devices for fluorescence correlation spectroscopy according to the invention. In the drawings

20

Figure 1 is a schematic section through a first device according to the invention and

25 Figure 2 is a schematic section through a second device according to the invention.

The embodiment of the invention shown in Figure 1 has a vessel holder 1 into which recesses are introduced as sample vessels 2 (numbered as an example). This embodiment also comprises a cover 3 with transparent plungers 4 (numbered as an example) which in the covered state protrude into the sample vessels 2.

35 On the opposite side of the cover 3 there are provided optical fibers 5 (numbered as an example) through which light can be passed through the plunger 4 into the sample

vessels 2 and out of said vessels. It is understood that the optical fibers 5 can also be provided instead of the plunger 4 and can protrude through the cover 3 into the sample vessel 2.

5

The bottom 6 (numbered as an example) of any one sample vessel is formed so that it is focussing and is mirrorized on its inside with a layer resistant to conventional buffer solutions.

10

For operation of this device, the sample vessels 2 are filled with a transparent medium as needed. This is continued until the plungers 4 are each immersed in the transparent medium after the cover 3 has been put in place.

15

In this respect, the gap 7 (numbered as an example) between the sample vessel 2 and the plunger 4 is used for pressure equalization and as temporary storage for excess transparent medium.

20

Since the lower side of the plunger 7 has a surface area perpendicular to the optical axis of the focussing bottom 6 of the sample vessel and the light from the optical fiber 5 passes almost perpendicularly through a light window located in this surface area into the sample vessel 2, the cover 3 does not need to be positioned very exactly with respect to the sample vessel 2. Slight lateral deviations are of no importance because of the parallel incidence of the light and the bottom 6 selected to be suitably focussing.

25

30

In the embodiment shown in Figure 2 sample vessels 2 (numbered as an example) with focussing, mirrorized bottoms 6 (numbered as an example) are provided in a vessel holder 1. On the vessel holder 1 there sits a cover 3 with a flat underside in which the optical fibers 5 (numbered as an example) are inserted corresponding to the sample vessels. In addition, in each sample vessel wall there are provided

35

openings 8 (numbered as an example) which open into supply lines or drain lines 9 (numbered as an example). These are used on the one hand for pressure equalization or overflow and in this way prevent transparent medium from passing  
5 over the sample vessel wall into other sample vessels 2 when the cover 3 is put in place. When the cover 3 is in place, these lines 9 can also be used to exchange sample liquid or to flush the sample vessels 2.

10 The lines 9 can on the one hand be formed by holes (as shown here). On the other hand, grooves may be provided in the upper side of the vessel holder 1, so that together with the cover 3 they form the lines 9. It is feasible to provide one of the openings 8 in the bottom area of the  
15 sample vessel 2.

The diameters of the openings 8 and the lines 9 and their positions are selected so that the sample vessels can be filled completely. As can be seen directly from Figure 2,  
20 it is also possible to pass the optical fibers 5 through the cover 3 into the sample vessels 2. Then it is no longer necessary to completely fill the sample vessels 2.

## CLAIMS

1. A device for fluorescence correlation spectroscopy,  
5 especially for multicolor fluorescence correlation  
spectroscopy, in which light rays are focussed in a  
transparent medium which is located in a sample vessel  
(2), characterized by a vessel holder (1) in which at  
least two sample vessels (2) with a focussing,  
10 mirrorized bottom (6) are provided, and a common cover  
(3) for both sample vessels (2) which is at least  
partially transparent to light.
2. The device according to Claim 1, characterized in that  
15 the sample vessels (2) are formed by recesses in the  
vessel holder (1).
3. The device according to Claims 1 or 2, characterized  
in that the focus is inside the sample vessel (2).
- 20 4. The device according to any one of Claims 1 to 3,  
characterized in that each sample vessel (2) exhibits  
pressure equalization.
- 25 5. The device according to any one of Claims 1 to 4,  
characterized in that the cover (3) has at least two  
plungers (4), each protruding into a sample vessel  
(2).
- 30 6. The device according to Claim 5, characterized in that  
at least one plunger (4) has dimensions such that  
between the plunger (4) and the sample vessel (2)  
there remains a gap (7) around the plunger (4).
- 35 7. The device according to Claims 5 or 6, characterized  
in that at least one plunger (4) has a surface area  
perpendicular to the optical axis of the focussing  
bottom of the sample vessel (6).

8. The device according to one of Claims 1 to 7, characterized in that the wall of the sample vessel (2) has an opening (8) which opens into a supply line and/or a drain line for the transparent medium.  
5
9. A method for fluorescence correlation spectroscopy, especially for multicolor fluorescence correlation spectroscopy, in which light rays are focussed in a transparent medium which is located in a sample vessel (2), characterized in that a plunger (4) having a light window facing the bottom (6) is inserted into the sample vessel (2) which has a focussing bottom (6), and the quantity of transparent medium is selected so that the light window of the plunger (4) is wetted by the medium.  
10  
15
10. The method according to Claim 9, characterized in that the plunger (4) is inserted to a position above the focus of the bottom (6).  
20
11. The method according to Claims 9 or 10, characterized in that the plunger (4) is immersed in the transparent medium.

ABSTRACT (FIGURE 1)

A device for fluorescence correlation spectroscopy, especially for multicolor fluorescence correlation spectroscopy in which light rays are focussed in a transparent medium in a sample vessel (2), comprises a vessel holder (1) in which at least two sample vessels (2) with a focussing, reflecting bottom (6) are provided, and comprises a common cover (3) for both sample vessels (2) which is at least partially transparent to light.

In a suitable method, a plunger (4) having a light window facing the bottom (6) is inserted into the sample vessel (2) and the quantity of transparent medium is selected so that the light window of the plunger (4) is wetted by the medium.